

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—158197

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 19/40
C 12 N 15/00
(C 12 P 19/40
C 12 R 1/07)

識別記号

庁内整理番号
7258—4B
7235—4B
—
6760—4B

⑭ 公開 昭和58年(1983)9月20日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ 発酵法によるイノシンの製造法

⑯ 特 願 昭57—41564
⑰ 出 願 昭57(1982)3月16日
⑱ 発 明 者 清水栄厚
川崎市中原区中丸子1165—2
⑲ 発 明 者 土田隆康
横浜市戸塚区上倉田町1730—13
⑳ 発 明 者 川崎伸樹

川崎市川崎区観音2—20—8

㉑ 発 明 者 田中崇
横浜市戸塚区小菅ヶ谷町995—3
2
㉒ 発 明 者 江井仁
逗子市池子二丁目30—2
㉓ 出 願 人 味の素株式会社
東京都中央区京橋1丁目5番8
号

明 細 書

1 発明の名称

発酵法によるイノシンの製造法

2 特許請求の範囲

バチルス属のブリンアナログ耐性を有する変異株の染色体遺伝子より得たブリンアナログ耐性に関与する遺伝子領域が組み込まれているベクターをバチルス属のアデニン要求性変異株に含有せしめたイノシン生産性微生物を増殖し、増地中に蓄積されたイノシンを採取することを特徴とするイノシンの製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は発酵法によるイノシンの製造法に関するものである。従来、発酵法によるイノシンの生産に関しては、アデニン要求性、又はそれに各種のブリンアナログ耐性を付与したバチルス属(特公昭38—28998、特開昭58—182998、特公昭58—2856)、プレバクテリウム属(特開昭51—5057)等

Agr. Biol. Chem., 42, 398(1978)等のイノシン生産菌が知られている。

本発明者らは上述のような従来のイノシンの製造法に対し、ブリンアナログ耐性を有するバチルス属の染色体より得たブリンアナログ耐性に関与する遺伝子領域を組み込まれているベクターをアデニン要求性のバチルス属の変異株に含有せしめたイノシン生産性バチルス属の微生物が蓄積のイノシンを蓄積することを見出した。

本発明はこの知見に基づいて完成されたものである。本発明でいうブリンアナログとはバチルス属の微生物の増殖を抑制し、かつその抑制がヒポキサンチン、イノシン、あるいはグーイノシン酸等を増地中に添加すれば全体的又は部分的に解除されるようなものである。例えば、8—アザデアニン、8—アザヒポキサンチン、8—アザアデニン、2,8—ジアミノプリン、8—メルカプトプリン、8—メルカプトプリンリボシド、8—メルカプトグアノシン等がある。

ブリンアナログ耐性に関与する染色体遺伝子の

特開昭58-158197 (2)

Δ, スルファエマルアミド、サルファアミトメジン、サルファメタジン等がある。

遺伝子供与菌より染色体DNAを抽出する方法は、例えばJ. Bacteriol., 88, 1065 (1966) に記載されているような通常の方法で行うことができる。

ベクターDNAとしては、バチルス属の菌体中で複製するプラスミド又はファージならば、どのようなものでもよい。例えばスタフィロコッカス属微生物由来のpT127, pC134, pC221, pC223, pUB112 (以上、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 1480 (1977) 参照)、pUB110 (J. Bacteriol., 124, 218 (1978) 参照)、pTP4, pTP5 (以上Microbiol Letters, 3, 65 (1978) 参照)、枯草菌由来のpL515, pL528 (以上、J. Bacteriol., 131, 698 (1977) 参照)、pL513 (J. Bacteriol., 123, 1487 (1977) 参照)、pPL1, pPL2 (以上、J. Bacteriol., 124,

供与菌はバチルス属のプリンアナログ耐性を有する変異株ならどのような菌種でもよいが、耐性のより高いものが望ましい。又、アデニン要求性株を親株として、プリンアナログ耐性を有する変異株を導くすれば、イノシン生産能を有する変異株を得ることができ、このような変異株を遺伝子供与菌として用いればよりよい結果が得られる。又、遺伝子供与菌として、アデニン要求性及びプリンアナログ耐性変異株に、さらに従来知られているようなイノシン生産能を向上させるような性質、例えばサルファ耐性、メタオキシ耐性等を付加した菌株を導出して用いれば、イノシンの生産性が高い菌株を得ることができ、このような菌株を染色体遺伝子供与菌として用いれば、より好ましい結果が得られる。

上記サルファ剤とはバチルス属の該生物の増殖を抑制し、かつその抑制がp-アミノ安息香酸又は高濃度の添加により全面的又は部分的に解除されるようなものである。例えば、サルファメニジン、サルファアミトメジン、サルファ^Δメタゾー

484 (1976) 参照)、テンプレートファージとしても知られるrho11 (Gene., 5, 88 (1979)), phi1105 (Gene., 5, 87 (1979)), SPO2 (Gene., 7, 51 (1979)) 等がある。更に上記プラスミドをもとにして構築した複製プラスミドも当然のことながらベクターDNAとして利用できる。

染色体DNA及びベクターDNAはそれぞれ制限エンドヌクレアーゼを用いて切断する。それぞれのベクターには置いた制限エンドヌクレアーゼがあるが、それは上記ベクターについての記載がある文献等に表示されてある。染色体DNAについては、切断が部分的に行なわれるように反応条件を調節すれば多くの種類の制限酵素が利用できる。

かくして得られた染色体DNA断片と、切断されたベクターDNAとを連結せしめる方法は、リガーゼを用いる通常の方法が使用できる。一方、ターミナルトランスフェラーゼを用いて染色体DNA断片と開環したベクターDNAとにデオキ

シアヌール酸とデオキシチヂル酸をそれぞれ付加し、混合した後フェーリングして連結せしめる方法も利用し得る。

かくして得られた染色体DNA断片を組み込んだ組換えベクターDNAの受容菌はバチルス属のアデニン要求性を有する変異株ならどのようなものでもよいが、プリンアナログ耐性を有していない菌株を用いれば、形質転換を選択する際に好都合である。更に組換えDNA受容菌としてプリンアナログ耐性を有し、より高いイノシン生産能を有する菌株を用いれば、よりイノシン生産性の高い形質転換株を得ることができる。受容菌としては当然イノシン分解能がより低いものを用いなければならない。

染色体DNAとベクターの混合物をDNA受容菌に導入するには例えばMolec. Gene. Genet., 165, 111 (1979) に記載されているような通常の方法が利用できる。

イノシン生産能を有し、プリンアナログ耐性に関連する遺伝子領域が組み込まれているベクター

を含有する形質転換株を選択するには、例えばベクター受容菌としてアデニン要求性変異株を用いて形質転換し、プリンアナログを含有する培地で生育してくる菌株を選択すればよい。又、ベクター-DNAの抗生物質耐性等の性質を併せもつ菌株を選択できるような培地を用いればより選別が容易である。プリンアナログ耐性及び例えばサルファ剤耐性、又はメチオニンスルフォオキソド耐性等に関与する遺伝子領域が組み込まれている組換えベクター-DNAの受容菌を選択する場合、これらの耐性を有する薬剤を含有している培地で生育してくる菌株を選別すればよい。

このようにして、一旦選別されたプリンアナログ耐性等に関与する遺伝子領域が組み込まれている組換えベクター-DNAは、形質転換株より抽出後、他の組換えベクター-DNA受容菌、例えばイノシン生産能を有する菌株に導入することによりイノシン蓄積量をさらに増大させることができる。この場合、受容菌はイノシン生産能のより高い菌株、例えばプリンアナログ耐性及びサルファ剤、

しちに抑制しつつないし5日も行なえばよい。かくして得られた培養液中には蓄積のイノシンが生成蓄積される。培養液よりイノシンを採取する方法はイオン交換樹脂等を用いる通常の方法でよい。

実施例

バチルス・ズブテリスAJ11831(アルゲニン、ロイシン要求株)からN-メチル-N'-エト-N-エトログアムジン変異処理によつて得られたアデニン要求性変異株AJ11831(FERM-P 6452)を得た。さらにこのアデニン要求性株から同様の変異処理によつて得られたイノシン生産菌AJ11832(FERM-P 6453)(アルゲニン要求性、ロイシン要求性、アデニン要求性、8-アザダニン耐性)、AJ11833(FERM-P 6454)(アルゲニン要求性、ロイシン要求性、アデニン要求性、8-アザダニン耐性、サルファジアジン耐性)を原株とし、これより次のような方法で新規イノ

特開昭58-158197(3)

又はメチオニンスルフォオキソド耐性等を併せもつ菌株を受容菌とすればさらに高いイノシン収率が得られる。

かくして得られたイノシン生産菌を用いてイノシンを製造する方法は従来のイノシン生産菌の培養方法と特に異なる。即ち、培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、および有機微量栄養素を含有する通常の培地である。炭素源としてはグルコース、シエーグルコース等の炭水化物が望ましい。窒素源としてはアンモニア水、アンモニアガス、アンモニウム塩、アミノ酸等が利用できる。無機イオンとしてはリン酸イオンが必要であるほか、カリウムイオン、マグネシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン等が適宜培地中に添加される。有機微量栄養素としてアデニン要求性を満足せしめるべき物質、例えばアデニン、アデノシン、又はRNA加水分解物等を添加する。その他にビタミン、アミノ酸等が有機微量栄養素として適宜使用される。

培養は好氣的条件下で、望ましくはpH 4ない

シン生産菌を造成した。

(II) 染色体DNAの調製

AJ11832、AJ11833、を各々1Lの「Bacto-Penasey Broth」(商品名、Difco社製)中で30℃で約2時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集菌後、通常のDNA抽出法(J. Bacteriol., 31, 1965(1965))により染色体DNAを抽出、精製し、AJ11832から3.107、AJ11833から3.777を得た。

(III) 染色体DNA断片のベクターへの挿入

ベクターとして自律増殖性のプラスミドpUB110(カナマイシン、ネオマイシン耐性を発現する)を用いた。(II)で得た染色体DNAを各々5μgずつとプラスミドpUB110 5μgずつを、それぞれ制限エンドレアーゼEcoRIを37℃で40分間作用させてDNA鎖を切断した。45℃で10分間の熱処理後、各両反応液を混合し、ATP及びジチオスライツール存在下、T₄ポリメラーゼ由来の

DNAリガーゼにて18℃にて24時間、
DNA鎖の連結反応を行なった。

(ii) 形質転換

バチルス・ズブテリスAJ11831(アルギニン、ロイシン要求株、アデニン要求性菌株)を「Penassay Broth」(Difco 社製)に接種して36℃にて1晩連続培養を行ない、培養増地I(グルコース5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L、 KH_2PO_4 8g/L、 K_2HPO_4 14g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L、チミン酸ナトリウム1g/L、酵母エキス2g/L、L-アルギニン250mg/L、L-ロイシン80mg/L、アデニン80mg/Lを含む)に接種し、37℃にて4時間連続培養を行なった後、さらに培養増地II(グルコース5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L、 KH_2PO_4 8g/L、 K_2HPO_4 16g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2g/L、チミン酸ナトリウム1g/L、酵母エキス0.2g/L、L-アルギニン80mg/L、L-ロイシン80mg/L及びアデニン80mg/Lを含む)へ接種

(プレート)に接種し、37℃で培養した。培養3日後には最小増地II上に6個のコロニー、最小増地IV上に4個のコロニーが出現したのでこれを約数し、各コロニーをそれぞれ純粋に分離した。

最小増地IIから得られた形質転換株の性質は、いずれもアルギニン要求性、ロイシン要求性、アデニン要求性、8-アザグアニン要求性、カナマイシン耐性を示し、最小増地IVから得られた形質転換株の性質は、いずれもアルギニン要求性、ロイシン要求性、アデニン要求性、8-アザグアニン耐性、サルファジアジン耐性、カナマイシン耐性を示した。

(iii) フリンアチロブ等の耐性領域を担うプラスミドpUB110の抽出

(ii)で得られたコロニーのうち、最小増地II上のコロニーAJ11834(FERM-P 6455)、増地IV上のコロニーAJ11835(FERM-P 6456)を用いて、C. J. Kadoらの方法(C. J. Bacteriol., 141, 1303(1981))

特開2002-58158(4)

し、37℃にて1.8時間連続培養を行なうことによつて、いわゆるコンピタントなDNA取込能を有する細胞を調製した(参考文献、J. Bacteriol., 51, 741(1981))。このコンピタント細胞懸濁液に(ii)で得たDNA溶液を各々、別々に加えて37℃でさらに連続培養を行なつて形質転換反応を完了させた。

次にAJ11833のDNAによる形質転換株を含む懸濁液をカナマイシン5μg/ml、グルコース5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L、 KH_2PO_4 8g/L、 K_2HPO_4 14g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L、チミン酸ナトリウム1g/L、L-アルギニン100mg/L、L-ロイシン180mg/L、アデニン80mg/L、カナマイシン5μg/ml、8-アザグアニン100μg/ml及び車天20g/Lを含むpH 7.2に調整した最小増地II(プレート)に接種し、37℃で培養した。又、AJ11833のDNAによる形質転換を含む懸濁液を最小増地IIに更にサルファジアジン100μg/mlを添加した最小増地IV

に基づいたDNA抽出法により各々別々に菌体のDNAを抽出し、アガロース電気泳動によつてプラスミドDNAと染色体DNAを分離し、プラスミドDNA区分を各々分離採取し精製した。

こうして得られた新規プラスミド、即ち菌株AJ11834から得られたプラスミドを(ii)で述べたのと同様の方法によつて、菌株のイノシン生産菌AJ11832へ形質転換法により再導入し、カナマイシン耐性株AJ11836(FERM-P 6457)を得た。又、AJ11835から得られたプラスミドをイノシン生産菌AJ11833へ形質転換法により再導入し、カナマイシン耐性株AJ11837(FERM-P 6458)を得た。

(iv) イノシンの生産

第1表に示す菌株を各々を培養してイノシン生産量を調べた。結果を第1表に示す。培養は500ml容積付フラスコ中にイノシン生産増地(グルコース80g/L、 NH_4Cl 16g/L、

KH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/L,
 FeSO₄·7H₂O 10 mg/L, MnSO₄·7H₂O 10
 mg/L, CaCl₂·2H₂O 2 g/L, アデニン
 200 mg/L、大豆蛋白加水分解液 40 mL/L、
 アルギニン 100 mg/L 及びロイシン 100
 mg/L を含み pH 6.8 に KOH で調整した。) を
 20 mL ずつ分注し、115℃で10分間加圧
 殺菌した後、予め斜面培地で培養して得た各菌
 菌株を接種後、34℃で72時間振盪培養を行
 なった。

特許出願 58-158197 (5)
 第 1 表

番号	株	イノシンの産生量
AJ11831	arg, leu, ada	0.7 g/L
AJ11832	arg, leu, ada, S-AG ^r	1.8 "
AJ11833	arg, leu, ada, S-AG ^r , SG ^r	2.7 "
AJ11834	arg, leu, ada/Km ^r , S-AG ^r	1.6 "
AJ11835	arg, leu, ada/Km ^r , S-AG ^r , SG ^r	2.3 "
AJ11836	arg, leu, ada, S-AG ^r /Km ^r , S-AG ^r	3.1 "
AJ11837	arg, leu, ada, S-AG ^r /Km ^r , S-AG ^r , SG ^r	4.0 "

arg アルギニン要求性
 leu ロイシン要求性
 ada アデニン要求性
 Km^r カナマイシン耐性
 SG^r サルファジアジン耐性
 S-AG^r S-アザグアニン耐性

特許出願人 味の素株式会社